

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



| | |
|-------|-------------|
| REC'D | 24 JAN 2001 |
| WIPO | PCT |

EP 00/08693

4

15/03
#462

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 13 849.7

Anmeldetag: 15. März 2000

Anmelder/Inhaber: Institut für Diagnostikforschung GmbH an
der Freien Universität Berlin, Berlin/DE

Bezeichnung: L-Selectin-Kontrastmittel

Priorität: 8.9.1999 DE 199 43 710.6

IPC: A 61 K 49/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. Januar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weilmayr

Zusammenfassung

- Die Erfindung betrifft neue Kontrastmittel zur Darstellung von
- 5 Lymphknotenveränderungen und entzündlichen Prozessen sowie von pathologischen Veränderungen, die mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

L-Selectin-Kontrastmittel

DE 1998 4876 A1
Antrag auf Erteilung eines Patents

- Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Kontrastmittel zur bildgebenden Diagnostik und
- 5 beschreibt neue Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen und entzündlichen Prozessen sowie von pathologischen Veränderungen, die mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind.
- 10 Unter endothelialen und leukozytären Liganden werden im folgenden die Liganden in den Lymphknoten Sgp50/GlyCAM-1, (Imai et al., 1993), CD34 (Baumhüter et al., 1993), MadCAM-1 (Berg et al., 1993), Sgp200 (Hemmerich et al., 1994), die Liganden auf Leukozyten PSGL-1 (Moore et al., 1992) und KG1a-Ligand (Sackstein et al., 1997) sowie die L-Selectinliganden auf entzündeten vaskulären Endothelien (Zakrzewicz et al.,
- 15 1997; Girard und Springer, 1995) verstanden.

- Als bildgebende Verfahren können die Kernspintomographie, Ultraschallbildgebung, Bildgebung unter Verwendung von Röntgenstrahlen (Röntgen oder Computertomographie), szintigraphische Bildgebung unter Verwendung von
- 20 Radionukliden (Gammakamerabildgebung, SPECT, PET) und die Bildgebung mittels Nahinfrarotstrahlung (NIR-Strahlung) dienen.

- Lymphknotenveränderungen werden bisher mittels Bildgebung unter Verwendung von Röntgenstrahlen (Computertomographie) aufgrund der Volumenzunahme diagnostiziert
- 25 oder in der Kernspintomographie durch Gabe von Kontrastmitteln dargestellt, die von Makrophagenpopulationen des Lymphknotens unspezifisch aufgenommen werden (Magnetite bzw. hochmolekulare gadoliniumhaltige Kontrastmittel für die Magnetresonanzbildgebung).

- Entzündliche Prozesse werden bisher unspezifisch durch den Nachweis des erhöhten Austritts von Plasmaflüssigkeit in das entzündete Gewebe direkt oder unter
- 30 assistierender Kontrastmittelgabe dargestellt. Alternativ können derartige Prozesse auch durch Leukozytenpopulationen diagnostiziert werden, die vorher mit geeigneten

Signalmolekülen in vitro oder in vivo markiert wurden. Als Signalmoleküle dienen dabei spezifische radionuklidmarkierte Antikörper gegen Leukozytenoberflächenantigene oder Magnetite, die von bestimmten Leukozytenpopulationen in vitro phagozytiert wurden. Alle diese Verfahren versuchen, Lymphknotenveränderungen und entzündliche Prozesse
5 indirekt darzustellen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existiert kein nachweislich funktionierender direkter und spezifischer Nachweis von Lymphknotenveränderungen und entzündlichen Prozessen sowie von pathologischen Veränderungen, die mit der spezifischen Expression von endothelialen Liganden verbunden sind, mittels bildgebender Diagnostik.

10

Die Internationale Patentanmeldung WO 93/06835 beschreibt ein Adhäsionsmolekül auf Leukozyten, sogenanntes L-Selectin, und gibt bereits Hinweise auf dessen Verwendung zur Darstellung von entzündlichen Prozessen. Insbesondere wird die Struktur der cDNA-Nukleotidsequenz dieses Moleküls und der entsprechenden Aminosäuresequenz
15 offenbart. Es wird vorgeschlagen, dieses Protein als Kontrastmittel zur Darstellung von entzündlichen Prozessen zu benutzen, indem man das Protein mit Radionukliden oder paramagnetischen Substanzen markiert. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung derartiger Kontrastmittel fehlt allerdings. Es gibt keine Hinweise darauf, wie die Markierung der Proteine erfolgen soll, und auch keine Beispiele dafür, daß die
20 markierten Proteine tatsächlich in vivo den gewünschten Effekt zeigen.

Es besteht nach wie vor ein großer Bedarf an spezifischen Kontrastmitteln für die Darstellung von Lymphknotenveränderungen oder entzündlichen Prozessen sowie ein Bedarf an spezifischen Mitteln zur Darstellung von pathologischen Veränderungen,
25 welche mit der spezifischen Expression von endothelialen Liganden verbunden sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, diese spezifischen Kontrastmittel sowie Verfahren zu deren Herstellung bereitzustellen.

30 Diese Aufgabe wird mit den neuen Kontrastmitteln und den Verfahren zu deren Herstellung gelöst.

Die neuen Kontrastmittel enthalten einen Rezeptor, z.B. Adhäsionsmoleküle wie das L-Selectin-Molekül, in seiner biologisch korrekten räumlichen Ausrichtung, so daß das Kontrastmittel spezifisch und selektiv an endotheliale Liganden binden kann. Biologisch korrekte Ausrichtung bedeutet, daß das N-terminale Proteinende mit der

5. ligandenbindungsfähigen Lektin-Domäne nach außen, von der Zelle oder von einem Träger oder der Signaleinheit weg zeigt, während das C-terminale Proteinende der vollständigen oder einer verkürzten Proteinsequenz in die Zelle bzw. nach innen zur Zelle oder zu einem Träger oder zu der Signaleinheit hin zeigt. Unter dem Begriff Rezeptor wird eine molekulare Einheit verstanden, welche spezifisch an die oben

10 definierten endothelialen und leukozytären Liganden bindet.

Besonders überraschend war die Erkenntnis, daß das Kontrastmittel dann besonders gut an seine Zielstruktur bindet, wenn der Rezeptor als Multimer vorliegt. Das bedeutet, daß das Kontrastmittel bevorzugt dann an die endothelialen Liganden bindet, wenn

15 wenigstens zwei Adhäsionsmoleküle, z.B. zwei L-Selectin-Moleküle, definiert und gerichtet an eine Signaleinheit gekoppelt sind.

Die Erfindung betrifft daher Kontrastmittel zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen

20 Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen Liganden verbunden sind, und welche dadurch gekennzeichnet sind, daß ein Rezeptor, ein Rezeptorfragment oder eine Gruppe von Rezeptoren für spezifisch exprimierte endotheliale und/oder leukozytäre Liganden in definierter Ausrichtung an eine Signaleinheit gekoppelt sind. Der Rezeptor ist bevorzugt ein L-Selectin-Molekül, ein L-

25 Selectin-Derivat oder ein Fragment von L-Selectin. Die Signaleinheiten variieren je nach Verwendungszweck: für die Kernspintomographie muß die Signaleinheit aus paramagnetischen oder superparamagnetischen Teilchen bestehen, bevorzugt sind

~~superparamagnetische Eisenoxidteilchen. Für diesen Verwendungszweck können auch~~

Gadoliniumkomplexe oder sonstige paramagnetische Metallkomplexe verwendet

30 werden. Für die Bildgebung mittels Röntgenstrahlen werden bevorzugt iodhaltige Moleküle oder solche mit Schwermetallatomen verwendet. Für die Ultraschallbildgebung werden stabilisierte Gasbläschen eingesetzt. In der Radiodiagnostik verwendet man Radionuklide als Signaleinheit. Schließlich können

Nahinfrarotfarbstoffe als Signaleinheiten für Kontrastmittel in der Nahinfrarotdiagnostik eingesetzt werden.

- Die Multimerisierung des Rezeptors kann auf zweierlei Weise erfolgen. Erstens können
5 mehrere Rezeptoren (z.B. L-Selectin) definiert und gerichtet an eine Signaleinheit
gekoppelt werden. Zweitens können bereits multimerisierte Rezeptoren (z.B. multimeres
L-Selectin) an die Signaleinheit gekoppelt werden.

a) Gerichtete Kopplung des Rezeptors an die Signaleinheit

10

- Um eine gerichtete Kopplung monomeren L-Selectins an partikuläre Träger zu ermöglichen, wurden Proteinformen erstellt, die am C-Terminus mit einer Kopplungsgruppe versehen sind, um so die korrekte räumliche Ausrichtung zu gewährleisten (Beispiel 2). Eine Kopplungsstruktur, die die Anforderungen von hoher Affinität und
15 geringer Größe optimal erfüllt, ist der Polyhistidin-Tag (multi-His, z.B. bestehend aus 4 oder mehr Histidinmolekülen), der mit Ni- oder Co-komplexierten Chelatoren (im folgenden vereinfacht Nickelchelator genannt) interagiert.

- Die gerichtete Kopplung kann erfolgen, indem ein multi-His-getaggtetes Selectin über z.
20 B. Ni^{2+} -Ionen an einen geeigneten Chelator gebunden wird. Die Chelatoren werden dazu an die Signaleinheit gekoppelt. Ist die Signaleinheit ein ferrimagnetisches Nanopartikel, wie z.B. ein Dextranmagnetit, so erfolgt die Kopplung durch Oxidation mit Natriumperiodat. Die Kopplungschemie basiert auf der Oxidation von Diolgruppen, die in Carboxydextran vorliegen. Da derartige Diolgruppen auch in Stärke vorliegen, sind
25 auch solche ferrimagnetischen Nanopartikel geeignet, deren Hüllmaterialien aus Stärke, Carboxydextran oder vergleichbaren Materialien bestehen. Weiterhin können die Chelatoren an mit Dextran oder vergleichbaren Hüllmaterialien beschichteten
~~nichtradioaktiven und radioaktiven Kolloidpartikeln gekoppelt werden. Die Chelatoren~~
können ebenfalls an kompakte oder gefüllte oberflächenmodifizierte Polymerkugeln
30 gekoppelt werden. Die Füllung der Polymerkugeln kann aus einem Gas, einem röntgendichten Material, einer radioaktiven Substanz oder Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. NIR-Farbstoffen bestehen. Die Chelatoren können auch an Dendrimerstrukturen gekoppelt werden, die wiederum mit fluoreszierenden Farbstoffen, röntgendichten,

paramagnetischen, ferrimagnetischen Signaleinheiten oder mit gasgefüllten oberflächenmodifizierten polymeren Signalmolekülen dotiert sind.

Die an partikuläre Träger (Nanopartikel, Kolloidpartikel, Polymerkugeln) gekoppelten Chelatoren, welche die Bindung an die multi-His-modifizierten Rezeptoren ermöglichen, können radioaktive Metalle oder Metallionen enthalten, die in der diagnostischen Bildgebung ein Signal geben.

Die gerichtete Kopplung von Selectinen kann weiterhin über andere molekulare Eigenschaften erreicht werden. So können beispielsweise die Signaleinheiten auf ihrer Oberfläche oder an ihrer Struktur Streptavidin oder andere Avidinvarianten tragen und

biotinylierte Selectine binden und umgekehrt. An die Signaleinheiten kann auch ein selectinspezifischer Antikörper gekoppelt werden, der außerhalb des aktiven Zentrums des Selectins bindet, und somit dessen Bindungsfähigkeit nach Kopplung an die

Signalpartikel nicht zerstört. Ein weiteres Verfahren zur Herstellung der

erfindungsgemäßen Kontrastmittel besteht daher darin, daß der C-Terminus eines L-

Selectin-Moleküls an ein Streptavidin-, Avidin- oder Biotinmolekül gekoppelt ist, die

Signaleinheit ein Biotin-, Streptavidin- oder Avidinmolekül enthält, und die Kopplung durch die spezifische Bindung zwischen Streptavidin und Biotin bzw. Avidin und Biotin beim Zusammengeben der L-Selectin-Moleküle mit der Signaleinheit entsteht.

b) Kopplung mit Hilfe multimerisierter Rezeptoren

Eine zweite Möglichkeit, L-Selectin-Moleküle gerichtet an eine Signaleinheit zu

koppeln, ist, L-Selectin-Chimären zu verwenden (Beispiel 3). L-Selectin-Ig-Chimären

bestehen aus L-Selectin und Immunglobulin-domänen. Dabei bestimmt die Art des

verwendeten Immunglobulinfragmentes (Ig) den Multimerisierungsgrad der Chimären:

Ig der γ -Klasse tragen 2 Fab-Fragmente, die gegen L-Selectin ausgetauscht wurden.

Somit tragen L-Selectin-IgG-Chimären 2 L-Selectinfragmente pro Molekül. Ig der μ -

Klasse tragen bis zu 10 Fab-Fragmente, die gegen L-Selectin ausgetauscht wurden.

Folglich tragen die L-Selectin-IgM-Chimären bis zu 10 L-Selectinfragmente pro

Molekül. Der Abstand der Ligandenbindungszentren der L-Selectine in den

Chimärenuntereinheiten entspricht dem ursprünglichen Abstand der Fab-Fragmente und beträgt im allgemeinen zwischen 1 und 8 nm, meist ca. 5 nm.

Chimäre Moleküle können auch aus L-Selectin und weiteren multimerisierenden Proteinen gebildet werden. Das Mannose-binding-Protein kann, bestehend aus 4 Untereinheiten, somit mit 4 L-Selectin-Einheiten dotiert werden. Das cartilage oligomeric matrix Protein (COMP, Tomschy et al., 1996) wiederum besteht aus 5
5 Untereinheiten, die N-terminal mit dem C-terminalen Ende des L-Selectins verknüpft werden können.

Die chimären Moleküle aus Selectin und dem Fc-Teil von Antikörpern können entweder über einen Antikörper gegen den Fc-Teil oder über Protein A, Protein L bzw. Protein G
10 - bakterielle Zellwandmoleküle, die den Fc-Teil von Immunglobulinen binden - gerichtet (und bereits multimerisiert!) an Partikeloberflächen gebunden werden. Die Kopplung von Protein G an die Oberfläche von Dextranmagnetiten wird in Beispiel 13 beschrieben.

Alle oben genannten chimären Moleküle aus Selectin und einem Multimerisierungsteil
15 können am C-terminalen Ende weitere Modifikationen tragen, z.B. einen multi-His-tag (Beispiel 4), an den wiederum Chelatoren binden können, die ihrerseits an Signaleinheiten gekoppelt sind, wie in Beispiel 5 beschrieben.

20 Mit dem Rezeptor oder den Rezeptorgruppen sind verschiedene Signaleinheiten verbunden, je nachdem, in welchem diagnostischen Verfahren das Kontrastmittel verwendet werden soll.

Zum Beispiel können als Signaleinheiten ferrimagnetische Partikel (Magnetite, Ferrite, Cobaltferrite u.ä.) verwendet werden, die aus einem monokristallinen ferrimagnetischen
25 Kern und aus einer Hülle bestehen (Beispiel 12 und 13). Die Hülle ist kovalent mit dem Kern verbunden oder umschließt den Kern vollständig ohne direkte chemische Bindung. Die Hülle kann aus Dextran, Stärke oder nieder- oder hochmolekularen aliphatischen oder aromatischen Ketten bestehen. Die Hülle verfügt entweder direkt über funktionelle
30 Gruppen (Amino-, Carboxyl-, Thiolgruppen, o.ä.), die zur weiteren Kopplung verwendet werden können, oder über Gruppen, die nach chemischer Aktivierung zur weiteren Kopplung funktionalisiert werden. Derartige Verbindungen sind z.B. in WO 92/12735, WO 92/22586, EP 0 186 616 und der US 4,101,435 beschrieben.

Es können auch Verbindungen verwendet werden, die aus der Kombination von ferrimagnetischen Partikeln und daran kovalent gekoppelten Verbindungen bestehen, wobei die kovalent gekoppelten Verbindungen mit funktionellen Gruppen versehen sein können oder dotierbare längerkettige aliphatische Verbindungen enthalten können.

5

Als Signaleinheiten können ferner paramagnetische Metalle und Metallverbindungen eingesetzt werden (insbesondere Gadoliniumkomplexe). Hierbei wird das Metallatom von einem Chelator komplexiert, der darüber hinaus direkt oder über einen Träger vermittelt weitere funktionelle Gruppen (Amino-, Carboxyl-, Thiolgruppen, o.ä.)

10 aufweist, die zur weiteren Kopplung verwendet werden können. Der Chelator kann hierbei auch auf Dendrimeren dotiert sein (Beispiel 14), wie sie z.B. in DE 43 444 60 beschrieben werden.

Die genannten Anforderungen werden auch von Verbindungen erfüllt, die aus der Kombination von Chelator und einem weiteren Element bestehen, das seinerseits

15 funktionelle Gruppen aufweist, die zur weiteren Kopplung verwendet werden können. Erfindungsgemäß können als solches Element dotierbare Dendrimere, dotierbare längerkettige aliphatische Verbindungen oder dotierbare Partikel mit einem Durchmesser von 4-200 nm, bestehend aus Magnetiten, Polystyren, Dextran, Stärke usw. verwendet werden.

20

Als Signaleinheiten können röntgendichte Moleküle (z.B. Iod-Verbindungen), Metalle, Metallverbindungen und Kolloide (z.B. kolloidale Goldpartikel, siehe Beispiel 6, 7 bzw. 11) eingesetzt werden. Hierbei werden die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen mit den röntgendichten Substanzen in Analogie zum oben genannten direkt oder indirekt

25 verbunden. So werden iodhaltige Verbindungen mit Kopplungsgruppen eingesetzt, an die Chelatoren zur Bindung von multi-His-L-Selectinen oder Fc-bindende Substanzen zur Bindung von L-Selectin-Chimären gekoppelt wurden. Indirekt verbunden bedeutet, daß die röntgendichten Moleküle in Signaleinheiten eingelagert werden, wobei letztere mit den Rezeptoren oder Rezeptorgruppen direkt verbunden werden.

30

Als Signaleinheiten können radioaktive Moleküle, Metalle, Metallverbindungen und Kolloide (z.B. kolloidale ^{198}Au - oder ^{199}Au -Partikel, siehe Beispiel 9 und 10) dienen,

die in Analogie zum oben genannten an die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen gebunden werden.

Als Signaleinheiten können fluoreszierende Farbstoffe (z.B. NIR-Farbstoffe) verwendet
5 werden. Diese können entweder direkt in Analogie zum oben genannten an die
Rezeptoren oder Rezeptorgruppen gekoppelt werden, oder indirekt mit diesen verbunden
werden (Beispiel 17 und 18). So können die Farbstoffe in Dendrimere dotiert werden, in
kompakte oder hohle farbstoffenthaltende Polymerpartikeln eingebunden werden oder
direkt an Substanzen (Protein A, Protein L, Protein G oder spezifische gegen die
10 Multimerisierungsdomäne gerichtete Antikörper) gekoppelt werden, die wiederum an die
Multimerisierungsdomänen chimärer L-Selectinmoleküle binden. Geeignete
Farbstoffmoleküle und deren Herstellung werden z.B. in WO 96/17628 beschrieben.

Als Signaleinheiten können gasgefüllte oberflächenmodifizierte Polymerkugeln genutzt
15 werden, die in Analogie zum oben genannten an die Rezeptoren oder Rezeptorgruppen
gekoppelt werden (siehe Beispiele 19 bis 21).

Beispiele

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Klonierung und Expression von L-Selectin

- 5 Aus der lgt10 cDNA Bank der humanen Lymphomzelllinie Raji wurde ein Klon isoliert, der den gesamten kodierenden Bereich von L-Selectin enthält und von 5'- und 3'- nicht translatierten Bereichen flankiert ist. Dieser wurde in den pCRII-Vektor des TA-CloningSystems® integriert. Das daraus resultierende Konstrukt wurde als LamTA4 bezeichnet und bildete die Grundlage für die Herstellung der L-Selectin Konstrukte.
- 10 Dabei ergibt sich die Abkürzung zur Benennung (siehe auch die Internationale Patentanmeldung WO 93/06835) des L-Selectin Konstruktes aus dem einklonierten Sequenzabschnitt. "sL" steht für "soluble" L-Selectin, das der löslichen Form des Moleküls entspricht, wie sie im humanen Serum vorkommt. Diese Form enthält die Lectin-, die EGF und 2 SCR-Domänen. Dagegen fehlen dieser Form die
- 15 cytoplasmatische und die transmembranäre Domäne, wobei bei der Konstruktion die physiologische Schnittstelle, an der sL-Selectin von der Zelloberfläche proteolytisch abgetrennt wird, eingehalten wird. Das sL-Fragment wurde mittels PCR aus dem Ausgangsklon LamTA4 generiert und wieder in den Vektor pCRII des TA-CloningSystems® integriert. Das rekombinante sL-Selectin wurde in einer glykosylierten
- 20 Form wie folgt hergestellt. Der sL-Selectin Sequenzabschnitt wurde in den Vektor pCR3.1 des TA CloningSystems® für die Expression in K562-Zellen und in den Vektor pMPSV-HE für die Expression in BHK-Zellen einkloniert. Anschließend wurden Klone isoliert und mittels Genitacin (im Falle des pCR3.1-Vektors) bzw. nach Kotransfektion mit Puromycin-resistenzvermittelnden Vektoren (im Falle des pMPSV-HE-Vektors)
- 25 selektiert. Die Kulturüberstände von L-Selectin-sezernierenden K562- bzw. BHK-Zellen wurden mittels Immunaффinitätschromatographie über CNBr aktivierte Sepharose-Matrix, an die der Antikörper DREG200 (Kishimoto et al., 1990) gebunden wurde, gereinigt. Die Quantifizierung der Mengen von L-Selectin zur Bestimmung der Ausbeute
- 30 erfolgte mittels ELISA unter Verwendung der Antikörper DREG200 und DREG55 (Kishimoto et al., 1990).

Beispiel 2: Klonierung und Expression von multi-His-L-Selectin

Unter Verwendung eines partiell komplementären PCR-Primers, der zusätzlich die Sequenz von sechs Histidinen (multi-His) trägt, wurde ausgehend von dem Ursprungsklon LamTA4 (siehe Beispiel 1) ein L-Selectin-Konstrukt mit C-terminaler Kopplungsgruppe generiert. Das sL-Selectin-multi-His-Fragment (kodiert das Protein multi-His-L-Selectin) wurde in die Expressionsvektoren pCR 3.1 (Invitrogen) und unter Berücksichtigung des Leserasters in SRa-GS-Seq (Berlex Lab., Inc.) und den Baculo Transfer Vektor pBBS 250 (Berlex Lab., Inc.) einkloniert. BHK-Zellen wurden mit multi-His-sL-Selectin-Konstrukt unter Zugabe eines Genitacin-resistenzvermittelnden Vektors transfiziert. Es wurden Klone isoliert, die in die Kulturüberstände das Protein multi-His-L-Selectin sezernieren.

Zur Expression des multi-His-L-Selectins in Insektenzellen wurde das multi-His-sL-Selectin-Konstrukt in den Baculo Transfer Vektors überführt und anschließend in das virale Genom transferiert. Mit diesen rekombinanten Viren wurden Sf9-, High Five™ und Estigmena acrea-Zellen infiziert. Die rekombinanten Proteine wurden, wie im Beispiel 1 beschrieben, mittels Immunaффinitätschromatographie an DREG200 gereinigt.

Beispiel 3: Herstellung und Expression von L-Selectin-Ig-Chimären

Die L-Selectin-IgG-Chimären, die pro Molekül 2 L-Selectine tragen, wurden von folgenden Konstrukten ausgehend hergestellt: Maus-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-mLS) im pCMV5-Expressionsvektor (Watson et al., 1990), Ratten-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-rLS) im pCDM8-Expressionsvektor (Tamatani et al., 1993), Humane-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-hLS) im pCMV5-Expressionsvektor (Mebius und Watson, 1993). Immunglobuline der μ -Klasse tragen 5 μ -globulinähnliche sternförmig angeordnete Moleküle und somit 10 Fab-Fragmente, die gegen L-Selectin ausgetauscht wurden. Somit tragen L-Selectin-IgM-Chimären 10 L-Selectinfragmente pro Molekül. Ausgehend von einem Konstrukt im pCDM8-Expressionsvektor wurde die Maus-L-Selectin-Humane-IgM-Chimäre hergestellt (Maly et al., 1996).

Die rekombinanten Expressionsvektoren wurden in *E. coli* amplifiziert, gereinigt und anschließend in eukaryotische Zellen transfiziert.

Die rekombinanten Vektoren der Maus-L-Selectin-Humane-IgM-Chimären wurden in COS-7 und in CHO-K1 Zellen mit einem Genitacin-resistenzvermittelnden Vektor

13

kotransfiziert. Stabil produzierende Klone beider Zelllinien wurden isoliert. Zusätzlich wurde das cDNA-Fragment, das für das Chimärenprotein kodiert, mit Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor pCDM8 herausgeschnitten und in den Vektor pcDNA3 subkloniert. Mit diesem Konstrukt wurden HEK293 Zellen transfiziert und Klone isoliert. Die Aufreinigung der hIgM-mLS Chimären erfolgte mittels Immunaffinitätschromatographie an MEL-14 (Bowen et al., 1990). Die Produktion und Reinigung der Chimären wurde mittels ELISAs verfolgt (MEL-14 als Fangantikörper und anti-hIgG-Phosphatase als Detektionsantikörper). Die IgG-Chimären (Human-, Ratten- und Maus-L-Selectin-Humane-IgG-Chimären) wurden durch Kotransfektion mit dem Vektor pcDNA3 in stabil produzierenden HEK293 und CHO-K1 Zellen hergestellt. Die Aufreinigung der hIgG-LS Chimären erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Protein G (Pharmacia): Nach dem Auftragen des Kulturüberstandes auf die Säule, wurde die Matrix mit 20 mM Natriumphosphat (pH 7,0) gewaschen. Eluiert wurde mit 0,1 M Glycin (pH 2,5), die Eluate wurden mit gesättigter K_2HPO_4 -Lösung neutralisiert.

Beispiel 4: Herstellung und Expression von L-Selectin-Ig-multi-His-Chimären

Die Maus-L-Selectin-Humane-IgG-Chimäre (hIgG-mLS) im pCMV5-Expressionsvektor (siehe Beispiel 3) wurde unter Verwendung eines partiell komplementären PCR-Primers, der zusätzlich die Sequenz von sechs Histidinen (multi-His) trägt, um eine am Fc-Fragment der Chimäre ansetzende C-terminale Histidin-Kopplungsgruppe verlängert (siehe Beispiel 2). Die Amplifikation, Reinigung und Transfektion des rekombinanten Expressionsvektors sowie die Isolierung von stabil produzierenden HEK293 Zellklonen erfolgte, ebenso wie die Produktion und Reinigung der multi-His-Chimären in Analogie zu der im Beispiel 3 beschriebenen Prozedur.

Beispiel 5: Synthese von radioaktiven Chelator-Signaleinheiten und Kopplung von multi-His-L-Selectinen als szintigraphische Kontrastmittel

U.a. sind Calcein und Newport Green (Molecular Probes, Inc.) Nickelionen komplexierende Chelatoren, die an multi-His-Proteine binden können. Darüber hinaus
5 sind Calcein und Newport Green iodierbar und können so als Signaleinheit zur szintigraphischen Bildgebung eingesetzt werden. Mit 1 nMol Newport Green wurden 10 µl 0,25 M Phosphatpuffer pH 6,5-7,5 (Iodierungspuffer), der 0,2 mCi Na¹²³I enthielt, sowie 5 µl Chloramin T (8 mg/ml in Iodierungspuffer) für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Na₂S₂O₅ (8 mg/ml in
10 Iodierungspuffer) sowie von 100 µl NaI (2 mg/ml in Iodierungspuffer) beendet. Anschließend wurden 1 nMol L-Selectin-IgG-multi-His-Chimäre (hergestellt nach Beispiel 4) und 1 µl 50 mM NiAcetat (50 nMol) zum iodierten Newport Green hinzugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Produkt (L-Selectin-IgG-multi-His-Chimäre)-(Ni)-(Newport Green)-(¹²³I) über eine PD10-Säule
15 in Phosphatpuffer von den niedermolekularen Substanzen (Nickelionen, ungebundenem Newport Green sowie Iodierungsreaktiven) gereinigt. Der Erhalt der Bindungsfähigkeit der iodierten L-Selectin-Chimäre wurde auf Cryoschnitten mit anschließender Mikroautoradiographie nachgewiesen.

20 Beispiel 6: Synthese von kolloidalem Gold

Für einen 100 ml Ansatz wurden 80 ml aqua dest. und 50 µl 20% H₂AuCl₄ vorgelegt und auf 60°C erwärmt. Nach Zugabe einer Lösung, die 4 ml 1% NaCitrat, 18 ml aqua dest. sowie 80 µl 1% Tannin enthielt, wurde das Reaktionsgemisch auf 95°C für 10 Minuten erhitzt. Der Farbumschlag der Lösung von gelb zu rot zeigt die Bildung der
25 Kolloidteilchen. Das Produkt wurde abgekühlt und sterilfiltriert. Der Durchmesser der Kolloide beträgt 8-12 nm.

Beispiel 7: Synthese von L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-kolloidalem Gold-Konstrukten

30 Zu 10 ml kolloidalem Gold (Herstellung siehe Beispiel 6) wurden 300 µl Protein G (2 mg/ml, in aqua dest) für 1 Stunde bei Raumtemperatur gegeben. Freies, in Lösung vorliegendes ungebundenes Protein G wurde durch mehrfaches Waschen gegen Puffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl), mittels Zentrifugation bei 30.000 g mit einem

Sorvall 80AT3-Rotor abgetrennt. Die Protein G-Goldkolloide wurden in 300 µl Puffer aufgenommen. Durch Tracermessungen konnte gezeigt werden, daß ca. 15 Protein G-Moleküle auf einem 10 nm kolloidalen Goldpartikel gebunden wurden.

- Anschließend wurden die IgG-Selectinchimären an diese Konstrukte gekoppelt. 50 µg Maus- oder Ratten-L-Selectin-IgG-Chimäre wurden zu je 300 µl Protein G-kolloidales Gold gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur konnten ca. 80-90 % der eingesetzten Chimärenmenge an die Protein G-Goldkolloide gebunden werden. Die Bindungsfähigkeit der IgG-Selectinchimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte an L-Selectinliganden wurde an Gefrierschnitten peripherer Lymphknoten und anschließender Silberfärbung gezeigt.

Beispiel 8: Wirknachweis mit L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukten

- NMRI-Mäusen wurde je Tier 12 µg Maus- bzw. Ratten-L-Selectinchimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte (Herstellung siehe Beispiel 7; Stoffmenge bezogen auf den L-Selectinchimärenanteil) bzw. als Kontrolle unbeladene Protein G-Goldkolloid-Konstrukte intravenös injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die peripheren Lymphknoten entnommen und in Gefrierschnitten mit nachfolgender Silberfärbung analysiert. Direkt nach dem "first pass" bis zu einem Zeitraum von 30 Minuten nach Injektion konnten im Falle der mit Selectinchimären-Konstrukten behandelten Tiere Goldkolloide an der luminalen Seite der hochendothelialen Venolen im Lymphknoten nachgewiesen werden. Tiere, die die Kontrollsubstanz erhielten, zeigten keinerlei Goldkolloide in den Lymphknoten.

Beispiel 9: Synthese von ^{198}Au -Kolloid-Protein G-L-Selectin-Ig-Chimären-Konstrukten (als szintigraphisches Kontrastmittel)

- 100 µg der L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloid-Konstrukte (Herstellung siehe Beispiel 7) wurden in der Neutronenstrahlaktivierungsanlage des Kernreaktors BERII in aqua dest. bestrahlt, bis eine spezifische Aktivität von 300 - 500 MBq /100 µg bezogen auf den L-Selectin-Anteil erreicht wurde.

Beispiel 10: In-vivo-szintigraphische Messung nach Gabe von ^{123}I -Newport Green-L-Selectin-Kontrastmittel bzw. ^{198}Au -Kolloid-Protein G-L-Selectin-Ig-Chimären-Kontrastmittel

Die Kaninchen wurden mit Ketamin / Xylazin narkotisiert. Die Konstrukte gemäß
5 Beispiel 9 mit einer spezifischen Aktivität von 300 - 500 MBq /100 µg bezogen auf den L-Selectin-Anteil wurden intravenös injiziert. Mittels dynamischer Messung im Minutentakt und abschließend mit einer statischen Messung nach 30 Minuten wurden die Tiere mit der Gammakamera SP4HR (Elsint, jetzt General Electrics) untersucht. Dabei wurden vor allem die Lymphknoten untersucht. Die Tiere wurden unter der
10 Kamera positioniert, und die erste Untersuchung erfolgte vor der Gabe des Kontrastmittels. Im Anschluß an die Injektion wurde das Tier zu verschiedenen o.g. Zeitpunkten untersucht. Dabei wurde für die Bildgebung mit ^{123}I -Isotopen ein APC 3-Kollimator und für die Darstellung der ^{198}Au -Isotope ein APC 6-Kollimator verwendet. Lage, Größe und Erscheinungsbild der einzelnen Lymphknoten wurden bestimmt.

15

Beispiel 11: In-vivo-Röntgenbildgebung nach Gabe von L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloid-Kontrastmittel

Die Tiere (Mäuse) wurden mit 0.05 ml Ketamin/Rompun (2:1) i. p. narkotisiert. Jeweils 25 µg der L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Goldkolloide (hergestellt nach Beispiel 7)
20 bzw. Protein G-Goldkolloide (als Negativkontrolle) wurden intravenös injiziert. Nach 30 Minuten wurden die Tiere mit einem 7fach zoomfähigen Mammographen (Picker) untersucht und die zervikalen und poplitealen Lymphknoten bei 25 kV und 10 mAs Bestrahlung dargestellt. Die Darstellung der Kontrastmittelanreicherung in den Lymphknoten erfolgte bei 45 kV und 4,5 mAs Bestrahlung.

25

Beispiel 12: Synthese von partikulären Chelator-Magnetiten und Kopplung von ~~multi-His-L-Selectin als Magnetresonanz-Kontrastmittel~~

Kopplung von NTA (Nitrilotriessigsäure-Derivat; α -N-[Bis-Carboxymethyl-]Lysin) an
30 Dextranmagnetite

Die Dextranmagnetite (US 4,101,435) wurden in wässriger Lösung mit einem 31fachen Teilchenüberschuß an Natriumperiodat (bezogen auf das Carboxydextran der

Dextranmagnetithülle) für 30 min unter Rühren im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) oxidiert. Anschließend wurde das Natriumperiodat quantitativ über eine Gelfiltration abgetrennt. Die Dextranmagnetite wurden in Phosphatpuffer (0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0) eluiert. Anschließend wurde NTA zu den oxidierten Dextranmagnetiten
5 hinzugegeben und für 2 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Dabei konnte NTA im Überschuß an die Dextranmagnetite gekoppelt werden. Anschließend wurde 1/10 Volumen des Reduktionsmittels Dimethylboran (150 mM in H₂O) hinzugegeben und für weitere 2 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt, gefolgt von einer Inkubation bei
10 4°C über Nacht. Die Abtrennung des ungebundenen NTA vom an die Oberfläche der Dextranmagnetite gebundenen NTA erfolgte über Gel- oder Ultrafiltration. Die Dextranmagnetite wurden in PBS oder in 0.1 M HEPES (jeweils pH 7.0-7.4) eluiert und durch die Zugabe von 5 mg/ml Carboxydextran (Endkonzentration) stabilisiert. Die Partikel wurden sterilfiltriert, und es wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von
15 0.1% hinzugegeben. Anschließend wurde der Eisengehalt der Suspension sowie die mittlere Teilchengröße der Partikel bestimmt.

Um die Kopplungseffizienz des NTA an die Partikeloberfläche zu überprüfen, wurden die Dextranmagnetite zunächst mit 10 mM EDTA in PBS oder 0,1 M HEPES für 1 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das EDTA über Gel-
20 oder Ultrafiltration abgetrennt, und die Probe mit Co²⁺, Ni²⁺ oder vergleichbaren zweiwertigen Ionen inkubiert, die von dem Chelator komplexiert werden. Überschüssige Ionen wurden dann über Gel- oder Ultrafiltration von den Partikeln abgetrennt. Die Anzahl an auf der Partikeloberfläche gebundenen NTA-Molekülen konnte durch eine ICP-Messung der gebundenen Ionen bei Subtraktion der Ionen, die an unmodifizierte
25 Dextranmagnetite binden, ermittelt werden.

Kopplung von multi-His-L-Selectin an NTA-Dextranmagnetite

Die NTA-tragenden Dextranmagnetite wurden zunächst mit Ni²⁺-Ionen (o. ä. Ionen) und dann mit multi-His-getaggten Selectinmolekülen in PBS oder 0.1 M HEPES mit 0.2% Milch (zur Reduktion unspezifischer Bindungen) für 10 min bei RT inkubiert.
30 Ungebundene Selectinmoleküle wurden über geeignete Ultrafiltrationseinheiten oder über Magnetsäulen (Miltenyi Biotec) bei angelegtem Magnetfeld) abgetrennt.

Die resultierenden Kontrastmittel-Konstrukte wurden *in vitro* auf ihre Bindungsfähigkeit z.B. im Gefrierschnitt peripherer Maus-Lymphknoten überprüft und konnten dann für In-vivo-Experimente zur Bildgebung eingesetzt werden.

5 **Beispiel 13: Synthese von Protein G-Magnetiten und Kopplung von L-Selectin-Ig-Chimären**

Kopplung von Protein G an Dextranmagnetite

Die Dextranmagnetite wurden zunächst wie im obigen Beispiel beschrieben, mit Natriumperiodat oxidiert. Überschüssiges Natriumperiodat wurde über Gelfiltration
10 abgetrennt, die Dextranmagnetite wurden in Natriumazetatpuffer (100 mM Natriumazetatpuffer pH 3.9) eluiert.

Anschließend wurde Protein G hinzugeben und für 2 h bei RT im Dunkeln unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Reduktion mit Dimethylboran erfolgte wie im obigen Beispiel beschrieben. Vor der Inkubation, die über Nacht stattfindet, wurde
15 zusätzlich zur Stabilisierung der Partikel 5 mg/ml Carboxydextran (Endkonzentration) hinzugegeben. Die Abtrennung des ungebundenen Protein G erfolgte über Ultrafiltration. Die Partikel wurden sterilfiltriert, und es wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0.1% hinzugegeben. Anschließend wurde der Eisengehalt der Suspension sowie die Teilchengröße der Partikel bestimmt. Die Kopplungseffizienz konnte ermittelt werden,
20 indem der Versuch in Anwesenheit kleinerer Mengen an radioaktiv markiertem Protein G durchgeführt wurde .

Kopplung von L-Selectin-Ig-Chimären

Anschließend wurden die Protein G tragenden Dextranmagnetite mit den IgG-Selectinchimären für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die
25 resultierenden Kontrastmittel-Konstrukte wurden *in vitro* auf ihre Bindungsfähigkeit z. B. im Gefrierschnitt peripherer Maus-Lymphknoten überprüft und konnten dann für In-vivo-Experimente zur Bildgebung eingesetzt werden. Bei ausreichend magnetischen
Partikeln konnten zuvor die ungebundenen IgG-Selectinchimären über Magnetsäulen (Miltenyi Biotec) bei angelegtem Magnetfeld abgetrennt werden.

30

Beispiel 14: Synthese von Dendrimer-Chelator-Signaleinheiten und Kopplung von multi-His-L-Selectin



-17-

- Verwendet wurden Metallchelator-tragende Dendrimere DSM-64-NTA-Gd-DTPA (Herstellung siehe WO 99/32154), die als Signaleinheit für MR-Bildgebung bis zu 28 Gadolinium-DTPA-Komplexe enthielten. 10 µg der Dendrimere, mit einer Bindungskapazität von bis zu 30 multi-His-Proteinen pro Dendrimer wurden durch
- 5 Inkubation mit 50 mM Nickelacetat mit Ni^{2+} -Ionen für 10 Minuten bei Raumtemperatur beladen und über PD10-Gelchromatographie von ungebundenen Ni^{2+} -Ionen gereinigt. Anschließend wurde der Ansatz mit 7 mg multi-His-getaggt Selectinmolekülen in 10 mM HEPES (pH 7.4) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Ungebundene Selectinmoleküle wurden über Gelchromatographie von den multi-His-L-Selectin-Dendrimern
 - 10 abgetrennt. Der Beladungsgrad betrug durchschnittlich 10-15 multi-His-L-Selectine pro Dendrimer.

- Die Bindungsfähigkeit dieser Kontrastmittel-Konstrukte wurde in vitro im Gefrierschnitt an peripheren Maus-Lymphknoten überprüft, indem die Komplexe nach Inkubation auf dem Gefrierschnitt mit dem nichtblockierenden Antikörper LAM1-14 (Mihelcic et al.,
- 15 1994) und anschließender Färbung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper detektiert wurden.

Beispiel 15: MR-Messung von Ex-vivo-Agar-Phantomen

- Die L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Magnetit-Konstrukte (hergestellt nach Beispiel
- 20 13) wurden Tieren (Mäusen, Ratten, Kaninchen) intravenös injiziert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (z.B. 5 Minuten, 0,5 Stunden, 1 Stunde) wurden die Tiere getötet (durch Injektion einer Überdosis Narkosemittels), und verschiedene Organe (Lymphknoten, Milz, Leber) wurden entnommen und gewogen.

Beispiel In-vivo-Gabe: 4 Tiere (NMRI, Schering SPF, 18 - 22 g, weibl.)

- 25 Narkose: 0.05 ml Ketamin/Rompun (2:1) i. p.

Maus 1 u. 2: Kontrolltiere

Maus 3: erhielt ca. 443 (~ 24.2 µg) µl DDM128N-Protein G i. v. (V. caudalis) als

Kontrolle.

-
- 30 Maus 4: erhielt ca. 525 (~ 24.3 µg) µl DDM128N-Protein G-Maus-L-Selectin-Ig-Chimären i. v. (V. caudalis)

Nach 5 Minuten wurden die peripheren Lymphknoten (inguinal, iliacal, zervikal, popliteal, axial), ein Stück der Leber und der Milz entnommen und gewogen.

- Vorbereitung des Agar-Phantoms: Anfertigung eines Agar-Phantoms: 2 % Agar-Lösung (für Mikrobiologie) mit 0,05 mM Magnevist[®]. Agar wurde in der Mikrowelle erhitzt (Einstellungen: quick digest: power 70 – 80 %, fan speed 100, time 10 min; pressure 10) bis die Lösung klar war und die Luftblasen verschwunden waren. Die erste Schicht (ca. 1-2 cm) wurde in ein rechteckiges Plastikgefäß eingefüllt, Abkühlung für ca. 30 – 60 min bei Zimmertemperatur. Die Organe wurden auf dem Agar angeordnet und mit einer 2. Schicht flüssigem Agar überschichtet. Die Abkühlung erfolgte bis zur Aushärtung, danach wurde das Phantom im Kühlschrank gelagert.
- MR-Messung: Das Phantom wurde mit verschiedenen Sequenzen gemessen. Zur Positionsbestimmung wurde eine T1-gewichtete Sequenz benutzt (z. B. TR 400 / TE 15, Rare Factor = 2, Averages = 4, Matrix 256 x 256; Schichtdicke 3 mm). Anschließend wurde das Phantom mittels Eisen (Magnetit)-sensitiver Sequenzen vermessen (T2-gewichtet: TR/TE 2500/14, Rare Factor = 16, Averages = 4, Schichtdicke 3 mm, Matrix 256 x 256; Gradienten-Echo: TR/TE 400/15, Averages = 4, Flipwinkel 30°). Für die Auswertung mit einem Bildverarbeitungsprogramm wurden ROI's (regions of interest) auf die einzelnen Organe gelegt, die Signalintensitäten bestimmt und verglichen.

Beispiel 16: In-vivo-MR-Messung nach Gabe von L-Selectin-Magnetit-Konstrukten

- Die Tiere (Mäusen, Ratten, Kaninchen) wurden narkotisiert (z. B. Ketamin / Xylazin) und die Konstrukte nach Beispiel 13 wurden intravenös injiziert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten (z.B. 5 Minuten, 1 Stunde, 4 Stunden) wurden die Tiere mit der Magnet-Resonanz-Tomographie untersucht. Dabei wurden vor allem die Lymphknoten und entzündete Areale untersucht. Die Tiere wurden im MR-Gerät positioniert und die erste Untersuchung erfolgte vor der Gabe des Kontrastmittels. Im Anschluß an die Injektion wurde das Tier zu verschiedenen o.g. Zeitpunkten mit verschiedenen Sequenzen untersucht. Zur Positionsbestimmung wurde eine T1-gewichtete Sequenz benutzt (z. B. TR 400 / TE 15, Rare Factor = 2, Averages = 4, Matrix 256 x 256, Schichtdicke 3 mm). Anschließend wurden die Tiere mittels Eisen-sensitiver Sequenzen dargestellt (z. B. T2-gewichtet: TR/TE 2500/14, Rare Factor = 16, Averages = 4, Schichtdicke 3 mm, Matrix 256 x 256; Gradienten-Echo: TR/TE 400/15, Averages = 4, Flipwinkel 30°). Für die Auswertung mit einem Bildverarbeitungsprogramm wurden ROI's (regions of interest)

auf die einzelnen Organe gelegt, die Signalintensitäten bestimmt und verglichen. Lage, Größe und Erscheinungsbild der einzelnen Lymphknoten wurden bestimmt.

Beispiel 17: Direkte und indirekte Kopplung von NIR-Farbstoffen an L-Selectin-

5 Ig-Chimären

- 1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure wird in Anlehnung an bekannte Literaturverfahren durch Umsetzung mit 3-Aminopropyl-t-butylcarbamate, Freisetzung der Aminogruppe durch saure Spaltung mit Trifluoressigsäure, in Aminopropyl]-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid übergeführt. Dieser, im folgenden als NIR-Farbstoff bezeichnet, wurde direkt mit den Maus- und Ratten-L-Selectin-Ig-Chimären kovalent gekoppelt. Die Kopplung erfolgt über eine Aminogruppe des Farbstoffes an die oxidierte Chimäre. Dabei erfolgte die Oxidation mittels Natriumperiodat mit einem 31fachen Molekülüberschuß bezogen auf die Stoffmenge der Chimäre (100 µg) für 30 min unter Rühren im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT).
15 Anschließend wurde das Natriumperiodat quantitativ über eine Gelfiltration abgetrennt und die Farbstoffinkubation mit 50fachem Überschuß an NIR-Farbstoff angeschlossen. Anschließend wurde 1/10 Volumen des Reduktionsmittels Dimethylboran (150 mM in H₂O) hinzugegeben und für weitere 2 h bei RT unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff und Reduktionsmittel wurde durch
20 Ultrafiltration in Phosphatpuffer (0.1 M Phosphatpuffer pH 7.0) abgetrennt. Die L-Selectin-Ig-Chimären konnten mit je 2-5 NIR-Farbstoffmolekülen beladen werden, deren Fluoreszenzquantenausbeute bei etwa 50% des Ausgangswertes lag. Die Bindungsfähigkeit der NIR-L-Selectin-Ig-Chimären wurde in vitro im Gefrierschnitt an peripheren Maus-Lymphknoten überprüft, indem die Lokalisation der NIR-
25 fluoreszierenden Komplexe nach Inkubation direkt mittels NIR-CCD-Mikroskopkamera gezeigt wurde.

- Bei der indirekten Markierung wurde 15 µg Protein G mittels Natriumperiodat mit einem 30fachen Molekülüberschuß bezogen auf die Stoffmenge an Protein G – wie für die direkte Markierung beschrieben – oxidiert, zwischengereinigt und mit 50fachem
30 Überschuß an NIR-Farbstoff Li196 inkubiert. Reduktion mit Dimethylboran und anschließende Reinigung erfolgten wie oben beschrieben. Anschließend wurden in einem Volumen von 100 µl in 10 mM HEPES (pH 7.4) 10 µg der NIR-Protein G-Konjugate mit äquimolaren Stoffmengen an Maus- bzw. Ratten-L-Selectin-Ig-Chimären

(60 µg) über Nacht bei 4°C versetzt. Eine Abtrennung der einzelnen Ausgangskomponenten vom sich gebildeten L-Selectin-Ig-Chimären-NIR-Protein G-Komplex war nicht erforderlich, da sich dieser zu 90% gebildet hatte, und die verbliebenen 10% der L-Selectin-Ig-Chimären die Bindung der Komplexe in vitro im Gefrierschnitt an periphere Maus-Lymphknoten kompetitiv nicht behinderten.

Beispiel 18: In-vivo-NIR-Messung nach Gabe von L-Selectin-NIR-Konstrukten

Die Tiere (Mäuse, Kaninchen) wurden narkotisiert (z. B. Ketamin / Xylazin), und die Konstrukte wurden intravenös injiziert. NMRI-Mäusen wurde je Tier 12 µg direkt markierte NIR-Maus-L-Selectinchimären (siehe Beispiel 17) intravenös injiziert. Eine Stunde nach der Injektion konnten die peripheren zervikalen und poplitealen Lymphknoten unter NIR-Fluoreszenz mit einer NIR-CCD-Kamera (RTE/CCD-576, Visitron Systems GmbH) direkt dargestellt werden.

Beispiel 19: Funktionalisierte gasgefüllte Mikrokapseln

(a) Herstellung der Mikrokapselsuspension

In einem 20 l Reaktor werden 7 l einer wäßrigen 1%igen Octoxynol-Lösung bei einem pH-Wert von 2.5 vorgelegt und mit einem Rotor-Stator-Mischer bei hohem Schergefälle gemischt, so dass eine Selbstbegasung mit starker Schaumbildung erfolgt. 100 g Cyanacrylsäurebutylester werden rasch (<1 Minute) zugegeben und dispergiert. Es wird 60 Minuten unter Selbst-begasung polymerisiert, wobei sich gasgefüllte Mikrokapseln ausbilden. In einem Scheidetrichter wird das Flotat separiert, der Unterstand abgelassen und das Flotat mit 3 l einer wäßrigen 0,02%igen Octoxynol-Lösung resuspendiert. Die so erhaltene Mikrokapselsuspension hat einen Polymergehalt von 9.46 mg/ml, eine Dichte von 0.943 g/ml und einen pH-Wert von 3.5.

(b) Funktionalisierung der gasgefüllten Mikrokapseln durch partielle Seitenkettenhydrolyse

2500 g einer Mikrokapselsuspension gemäß (a) werden unter Rühren mit 501g Natronlauge der Konzentration $8 \cdot 10^{-2}$ mol/l versetzt. Es resultiert im Reaktionsansatz

-21-

ein pH-Wert von 12.1. Es wird 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH 3.5 eingestellt.

Beispiel 20: Bindung von L-Selektin an funktionalisierte gasgefüllte Mikrokapseln

5.

Die Mikrokapselsuspension gemäß Beispiel 19 wird durch mindestens 5malige Flotation gereinigt. 1 ml der gereinigten Mikrokapselsuspension mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^9$ Partikeln pro ml werden in 10 mM Acetat, pH 4.0 umgepuffert und mit 0.1 M EDC/NHS aktiviert. Anschließend wird mit 0.25 mg Protein G (5facher Überschuß) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch eine 15minütige Inkubation mit 1M Ethanolamin abgeschlossen.

10

Die gasgefüllten Mikrokapseln, an denen Protein G gebunden wurde, werden durch mehrfaches Waschen mittels Zentrifugation bei max. 500 g gereinigt. Die gereinigten, gasgefüllten Protein G-bindenden Mikrokapseln werden über Nacht mit 100 µg L-

15

Selektin-Ig-Chimären inkubiert.

50 % der L-Selektinmenge wurde an den Mikrokapseln gebunden (FACS-Messung: Sättigungsreihe mit anti-Selektin-Antikörpern).

Beispiel 21: In-vivo-sonographische Messung nach Gabe von L-Selectin-Ig-

20 Chimären-Protein G-Polymermikrokapseln

Die Kaninchen wurden mit Ketamin / Xylazin narkotisiert. 1 ml der echogenen L-Selectin-Ig-Chimären-Protein G-Polymermikrokapseln (L-Selectin-Polymermikrokapseln, siehe Beispiel 20) mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^9$ Partikel/ml in isotoner wässriger Dispersion wurden intravenös injiziert. Als Kontrolle wurden Protein G-Polymermikrokapseln ohne L-Selectin-Ig-Chimären-Beladung injiziert. Direkt nach Gabe des Kontrastmittels wurde mit der sonographischen Bildgebung der cervicalen und poplitealen Lymphknoten im Harmonic Imaging Modus begonnen.

25

Aufgrund der hepatischen Clearance ungebundener Polymermikrokapseln erreichte nach 30 Minuten das Signal-Hintergrundsverhältnis der sich im Target anreichernden L-

30

Selectin-Polymermikrokapseln optimale Werte.

Literatur

- 5 Baumhater, S., Singer, M. S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S. D., and Lasky, L. A. (1993). Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262, 436-8.
- Berg, E.-L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366, 695-8.
- 10 Bowen, B. R., Fennie, C., and Lasky, L. A. (1990). The Mel 14 antibody binds to the lectin domain of the murine peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol* 110, 147-53.
- Girard, J. P., and Springer, T. A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized
15 endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16, 449-57.
- Hemmerich, S., Butcher, E. C., and Rosen, S. D. (1994). Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. *J Exp Med* 180, 2219-26.
- 20 Imai, Y., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1993). Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 361, 555-7.
- Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., and Butcher, E. C. (1990). Identification of a human
25 peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2244-8.
-
- Maly, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C. E., Smith, P. L., Marks, R. M., Kelly, R. J., Gersten, K. M., Cheng, G., Saunders, T. L., Camper, S. A., Camphausen, R. T., Sullivan,
30 F. X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., von Andrian, U. H., and Lowe, J. B. (1996). The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86, 643-53.

- Mebius, R. E., and Watson, S. R. (1993). L- and E-selectin can recognize the same naturally occurring ligands on high endothelial venules. *J Immunol* 151, 3252-60.
- Mihelcic, D., Schleiffenbaum, B., Tedder, T. F., Sharar, S. R., Harlan, J. M., and Winn, R. K. (1994). Inhibition of leukocyte L-selectin function with a monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *Blood* 84, 2322-8.
- Moore, K. L., Stults, N. L., Diaz, S., Smith, D. F., Cummings, R. D., Varki, A., and McEver, R. P. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 118, 445-56.
- Sackstein, R., Fu, L., and Allen, K. L. (1997). A hematopoietic cell L-selectin ligand exhibits sulfate-independent binding activity. *Blood* 89, 2773-81.
- Tamatani, T., Kuida, K., Watanabe, T., Koike, S., and Miyasaka, M. (1993). Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. III. Characterization of the LECAM-1 (L-selectin)-dependent adhesion pathway in rats. *J Immunol* 150, 1735-45.
- Tomschy, A., Fauser, C., Landwehr, R., and Engel, J. (1996). Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *Embo J* 15, 3507-14.
- Watson, S. R., Imai, Y., Fennie, C., Geoffroy, J. S., Rosen, S. D., and Lasky, L. A. (1990). A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules. *J Cell Biol* 110, 2221-9.
- Zakrzewicz, A., Gräfe, M., Terbeek, D., Bongrazio, M., Auch-Schwelk, W., Walzog, B., Graf, K., Fleck, E., Ley, K., and Gaeltgens, P. (1997). L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood* 89, 3228-35.



-25-

11. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein mit Gas gefülltes Teilchen ist.
12. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein paramagnetisches Metallatom enthält.
- 5 13. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Schwermetallion enthält.
14. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein iodhaltiges Molekül enthält.
15. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein
10 Radionuklid enthält.
16. Kontrastmittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Signaleinheit ein Farbstoffmolekül enthält, welches Nahinfrarotstrahlung absorbiert.
17. Kontrastmittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor mit Hilfe einer Kopplungsgruppe an die Signaleinheit gekoppelt ist.
- 15 18. Kontrastmittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe ein Polyhistidinrest ist.
19. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder
20 leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein multimerisierter Rezeptor, welcher an die endothelialen Liganden bindet, an eine Signaleinheit gekoppelt wird.
20. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der multimerisierte Rezeptor eine L-Selectin-Ig-Chimäre ist.
- 25 21. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere

Rezeptoren, welche an die endothelialen Liganden binden, definiert und gerichtet mit
30 Hilfe einer Kopplungsgruppe an eine Signaleinheit gekoppelt werden.
22. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppe ein Polyhistidinrest ist.

23. Verfahren zur Herstellung von Kontrastmitteln zur Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der C-Terminus eines L-Selectin-Moleküls an ein Streptavidin-, Avidin- oder Biotinmolekül gekoppelt ist, die Signaleinheit ein Biotin-, Streptavidin- oder Avidinmolekül enthält, und die Kopplung durch die spezifische Bindung zwischen Streptavidin und Biotin bzw. Avidin und Biotin beim Zusammengeben der L-Selectin-Moleküle mit der Signaleinheit entsteht.
24. Verwendung von L-Selectin-Ig-Chimären zur Herstellung von Kontrastmitteln für die Darstellung von Lymphknotenveränderungen, von entzündlichen Prozessen oder von pathologischen Veränderungen, welche mit der spezifischen Expression von endothelialen und/oder leukozytären Liganden verbunden sind.